

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590204

研究課題名（和文）精子形成における PKC デルタ分子の機能解析及び男性不妊原因解明への試み

研究課題名（英文）PKCdelta molecules specifically expressed in testis

研究代表者

新野 由子 (NIINO YUKO)

昭和大学・医学部・兼任講師

研究者番号：60398683

研究成果の概要（和文）：本研究期間において、(1)精巣特異的に発現する PKC デルタ遺伝子のコンディショナルノックアウトマウス作出を主軸に、(2)PKC デルタ IV～VII 分子のアポトーシスへの関与、(3)PKC デルタ分子の細胞内基質の探索、(4)PKC デルタ分子の下流シグナル分子の探索、等を研究した。ノックアウトマウスは 2012 年 6 月以降に、Cre マウスとの交配を計画中。精巣特異的 PKC デルタ分子のアポトーシスへの関与は認められず、細胞内基質として、ラミン B1 のリン酸化が認められた。

研究成果の概要（英文）：In the present study by this fund, we performed (1) generation of the transgenic mice of Cre genes to generate PKCdelta conditional knockout mice, (2) confirmation the PKC deltaIV~VII molecules were not involved in the apoptosis, (3) search for the substrates of the PKCdeltaIV, (4) search for the molecules in the downstream of PKCdeltaIV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：精子形成・PKC デルタ・ノックアウトマウス・精巣・リン酸化基質

1. 研究開始当初の背景

Protein Kinase C(PKC)は細胞内情報伝達機構において重要な役割を果たすセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞増殖、細胞分化、腫瘍形成、細胞死などに関与している。細胞内情報伝達に非常に重要な PKC であるが、精巣内での解析は遅れている。我々は精子形成過程における PKC の機能を明らかにする事を目的に本研究を行った。精巣特異的に発

現する PKC デルタ分子種は、1つの遺伝子から少なくとも6つの分子が alternative splicing により産生され、精巣においては、特にデルタ IV とデルタ V の発現量は非常に多く、発現ステージも round spermatid に限定されている。また、デルタ VI とデルタ VII は spermatogonia にのみ、発現している事を確認している(Kawaguchi et al., 2006)。このことは、PKC デルタ IV, V, VI, VII 各分子種

が精子形成過程においてそれぞれ特有の重要な機能を持つことを表しており、本分子の機能を解明することは基礎科学の面では新しい精巣特異的な情報伝達機構の解明に寄与し、臨床面においては哺乳類の精子形成過程を明らかにすることに大きく寄与するとともに、男性不妊症の原因解明とその治療に大きく貢献すると期待できる。

2. 研究の目的

(1) アポトーシス

PKC デルタ分子に関しては他の PKC 分子と異なり、アポトーシスとの関わりが知られているが、これはデルタ I, デルタ IV, デルタ VI の分子内にあるカスプー 3 の認識配列が関与すると考えられる。しかし、この配列を持たない分子が対になって存在する(デルタ II, デルタ V, デルタ VII)という興味深い事実が明らかになり、分子種別にアポトーシスとの関連を調べることは重要である。一方、PKC デルタ IV とデルタ V を培養細胞内に高発現させると細胞が rounding するという現象が見られ(Niino et al., 分子生物学会 2006)、この現象がアポトーシスと関連するものかどうかを明らかにする。

(2) PKC シグナルの下流を探索

PKC はシグナル伝達のセカンドメッセンジャーであるので、このシグナルの下流分子を探る試みをすべきである。このため、培養細胞を用いて PKC デルタ各分子を高発現させ、代表的な転写因子の動きを探る。代表的なエレメント配列にレポーター遺伝子をつなげたものを理化学研究所 DNA Bank より購入し、研究に使う。

(3) コンディショナルノックアウトマウスの作成

実際の分子の生体内における機能を知るためにはノックアウトマウスの作成は必須である。精巣特異的 PKC デルタ分子のノックアウトマウス作成は最重要課題である。

3. 研究の方法

(1) アポトーシス

①核変化の観察：新規 PKC デルタ-EGFP 融合タンパク質を培養細胞内で発現させ、それが原因でアポトーシスを起こしているかどうかを調べるために、発現ベクター導入後、24 時間でヘキストまたは dapi による核染色像を観察する。

②アネキシン V 染色によるアポトーシスの確認をする。

③EGFP の蛍光を用いて FACS sorting で PKC ポジティブな細胞を選択し、FACSscan による細胞周期の解析で確認し、選別した細胞内で DNA のフラグメンテーションが起きているかどうかを電気泳動で、調べる。

④PKC デルタ阻害剤による効果を見る。上

記①-③の実験でアポトーシスが見られた場合、同様の実験を PKC \square 阻害剤・Rottlerin を用いて行い PKC デルタ分子によるアポトーシスであることを確認する。これにより、PKC \square によるアポトーシスが確定すれば、精子形成時に起きているアポトーシスの原因が推定できる。

(2) PKC シグナルの下流を探索

細胞周期・増殖に関する転写因子である E2F、Rb、p53 などの転写因子や、そのほかの転写因子の結合配列を Luciferase につないだベクターを、理化学研究所 DNA Bank 内の Response Element Bank より購入し、PKC \square 発現ベクターと共に培養細胞に共導入、Luciferase の活性測定により PKC デルタの下流シグナルを探る。これにより、PKC デルタのシグナルが最終的にどのような転写因子を動かしているのかが明らかになる。転写因子によってはこういった遺伝子の転写制御に関わっているのか予想がつくものも多く、精子形成にこういったシグナルが PKC デルタを通して関与し、どういう遺伝子の発現制御をしているのかを予想する。

また、この研究の一端として、精巣特異的 PKC デルタ IV の高発現系システムを用い、HEK293 細胞から PKC デルタ IV のリン酸化基質を同定する。方法としては、二次元電気泳動後、MS 解析を行う。

(3) コンディショナルノックアウトマウスの作成

精巣特異的な PKC デルタ IV, V, VI, VII 分子の機能を知るために、Cre-Lox システムを導入したノックアウトマウスを作成する。そのため、PKC デルタ遺伝子の構造を熟慮した結果、エキソン 7 の前後に Cre 配列を導入し、ノックアウトベクターを構築することとした。この研究は新潟大学脳研究所 細胞神経生物学分野 崎村建司教授との共同研究で行うこととなったが、当該研究室はこれまで多くの C57BL6 マウスでのノックアウトマウスを作成している。C57BL6 ノックアウトマウスが継代できるようになれば、マウスの系統を戻す手間も必要なく、すぐに解析ができる利便性がある。

4. 研究成果

(1) アポトーシス

PKC デルタ分子は、細胞のアポトーシスに関与しているという報告が多くある。一方、精巣内ではアポトーシスによる細胞死が多いことが報告されている。そこで、これら精巣特異的 PKC デルタ分子を培養細胞内で強制

発現させ、アポトーシスとの関連を調べた。PKC デルタと EGFP との融合タンパクを細胞内で発現させ、①EGFP の蛍光を用いて FACS sorting で PKC ポジティブな細胞を選択し、ヘキストおよび dapi による核染色像を観察、②アネキシン V 染色によるアポトーシスの確認、③FACSscan による細胞周期の解析等を行ったが、PKC デルタ IV, V, VI, VII 分子のアポトーシスへの関与は認められなかった。

このことから、PKC デルタ分子種でこれまで機能の1つと言われていたアポトーシスへの関与ということが、精巣特異的な分子では当たらないことが明らかになった。PKC デルタ分子 IV, V 分子種を培養細胞内で発現させ、活性化すると、細胞が rounding することを考え合わせると、PKC デルタ IV, V については、精巣において精子形成の過程における精子細胞への形態変化に関与している可能性が高く、PKC デルタ遺伝子の異常が男性不妊の原因の1つである可能性が高くなったと考えられる。

(2)PKC シグナルの下流を探索

①PKC デルタ IV 分子の下流にある転写因子を知るために、転写因子 AP-1, CRE, GRE, HSE, NF- κ B, SRE, E2F, Myc, p53, Rb の結合配列を Luciferase につないだベクターを使って PKC デルタ I, IV, VI 分子の効果を調べた。p53, c-Myc が PKC デルタ IV で減少傾向を示した。しかし、はっきりした大きな差は出なかった。

②培養細胞内に PKC デルタ IV を発現させると細胞が rounding する。このときの基質を知るために MS 解析を行った。その結果、PKC デルタ IV は、細胞核の各ラミナを構成する中間径フィラメントである、ラミン B1 を

リン酸化することがわかった。

PKC デルタ分子のシグナル伝達の下流分子を知ることは、PKC デルタ分子の最終的な機能をする上で重要である。PKC デルタ分子のシグナルの流れをしることで、何らかの原因でこの流れが阻害されたことがカバーできると思われる。この解析は現在、鋭意続行中である。

(3)コンディショナルノックアウトマウスの作成

2012 年 3 月現在、キメラマウスからホモの仔マウスが十分に増え、Cre マウスとの交配を計画中である。このマウスは C57BL6 で作出されており、マウスの系統を変えずに表現型の解析に進むことができるという点で、非常に優れている。

このコンディショナルノックアウトマウスを解析できれば、PKC デルタ分子の機能解析が大きく前進することになる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

①新野由子、小倉潔、相内敏弘、中町智哉、塩田清二、精巣特異的な分子 PKC δ IV の基質解析、第 34 回日本分子生物学会、2011 年 12 月、横浜

②新野由子、小倉潔、相内敏弘、中町智哉、塩田清二、精巣特異的に発現する PKC δ IV 分子の基質解析、第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会、合同大会、2010 年、12 月 9 日、神戸

③中町智哉、新野由子、小倉潔、塩田清二、マウス精巣における PKC δ の組織分布、第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2010 年、3 月、岩手

④新野由子、小倉潔、中町智哉、塩田清二、精巣特異的 PKC δ 分子の機能解析、第 32 回

日本分子生物学会、2009年、12月、横浜

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新野 由子 (NIINO YUKO)
昭和大学・医学部・兼任講師
研究者番号：80102375

(2) 研究分担者

塩田 清二 (SHIODA SEIJI)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号：80102375

(3) 研究分担者

小倉 潔 (OGURA KIYOSHI)
東京都医学総合研究所・主任研究員
研究者番号：70233492

(3) 連携研究者

()

研究者番号：